

鸭源呼肠孤病毒 DRV-G2 株 S2 基因的序列分析 及其表达

刘红, 郁宏伟, 朱朝辉, 吴志新, 李苏芝, 廖明*

(华南农业大学 兽医学院, 广东 广州 510642)

摘要: 采用 RT-PCR 方法从鸭源呼肠孤病毒 DRV-GZ 株中扩增出了 S2 基因片段, 将其克隆到表达载体 pET-28a(+) 中, 测序验证后转化入表达宿主菌 Rosetta™ 2(DE3)plysS 进行 IPTG 诱导表达。结果表明, 重组菌可表达出相对分子质量约为 50 000 的重组融合蛋白, 在浓度为 0.6 mmol/L 的 IPTG 诱导 4 h 的情况下表达效果最好。表达的蛋白以包涵体的形式存在于菌体中。表达产物经 Ni 柱纯化后可得到纯度较高的目的蛋白。经 Western-blot 分析, 所纯化的蛋白能与抗呼肠孤病毒 DRV-GZ 株阳性血清进行特异性的免疫印迹反应, 证实表达的蛋白具有较好的反应原性。

关键词: 鸭源呼肠孤病毒; S2 基因; 克隆; 原核表达; 纯化; 免疫印迹

Sequence analysis and expression of S2 gene of reovirus strain DRV-GZ originated from duck

LIU Hong, YU Hong-wei, ZHU Chao-hui, WU Zhi-xin, LI Su-zhi, LIAO Ming*

(College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: S2 gene of reovirus strain DRV-GZ originated from duck was amplified by RT-PCR and cloned into the pET-28a(+) expression vector. After sequencing, the recombinant plasmid was transformed into Rosetta™ 2(DE3)plysS. The transformed bacteria were induced by IPTG and produced a recombinant protein of 50 ku in mass. The result showed that 0.6 mmol/L IPTG and 4 h of induction time were the best conditions for this protein production and more pure proteins would be produced after Ni⁺-column purification. The purified protein could react with the positive serum with the antibody against strain DRV-GZ in a Western-blot test, which showed that the expressed protein had strong reactogenicity.

Key words: reovirus-originated duck; S2 gene; cloning; prokaryotic expression; purification; Western-blot

收稿日期: 2007-10-08; 修回日期: 2008-12-24

基金项目: 广东省科技计划项目(2006A20301001); 教育部新世纪优秀人才支持计划项目(NCET-06-0752); 广东省动物防疫检疫专项(粤农[2006]264号)

作者简介: 刘红(1981-), 女, 浙江宁波人, 硕士生。* 通讯作者, Tel: 020-85287436, E-mail: mliao@scau.edu.cn。刘红、郁宏伟对本文贡献相同

禽呼肠孤病毒(avian reovirus, ARV)为呼肠孤病毒科、正呼肠孤病毒属的成员, 它能感染多种禽类, 包括鸡、火鸡、鹅、番鸭、鸽、北京鸭、鸚鵡和其他野鸟^[1-5]。该病毒可引起关节炎、腱鞘炎、矮小综合征、呼吸道病、肠病、吸收障碍综合征和骨质疏松、免疫抑制等疾病^[5], 造成家禽屠宰废弃率高, 饲料转化率低, 继发感染频发等, 对养禽业(尤其种禽饲养)危

害极大。禽呼肠孤病毒的基因组含有双链 RNA 的 10 个片段, 至少编码 12 种不同的病毒蛋白^[6]。由 S2 基因编码的蛋白 σA , 是 5 个内壳蛋白之一, 能抵抗干扰素对呼肠孤病毒的作用。目前, 对鸭呼肠孤病毒全基因组序列及其他水禽的呼肠孤病毒的相关研究甚少。2005 年广东省某市出现了一种以肿头、软脚、流泪, 拉黄绿色稀粪, 肝出血和坏死及食道泄

殖腔溃疡和结痂为主要特征的鸭病。在进行病因调查时,笔者分离到多株病毒,其中包括 1 株呼肠孤病毒 DRV-GZ 株^[7]。由于以前的国内外研究中很少见到关于白鸭感染呼肠孤病毒的报道,对其生物学特性知之甚少。为进一步了解其致病机理,本研究对 GRV-GZ 株的 S2 基因进行了克隆测序及原核表达。

1 材料与方法

1.1 病毒和阳性血清

鸭源呼肠孤病毒 DRV-GZ 株由华南农业大学禽病研究室分离、纯化和保存^[7]。兔抗 DRV-GZ 阳性血清按常规方法制备,由华南农业大学禽病研究室保存。

1.2 菌株、载体及试剂

克隆宿主菌 *E. coli* DH5 α 、表达宿主菌 RosettaTM 2(DE3)plysS 和表达载体质粒 pET-28a(+)由华南农业大学禽病研究室提供;限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Xho* I、T4 DNA 连接酶、抗 His 标签单抗和辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠 IgG 均为佰路公司产品;HisTrapTM HP 为 Amersham 公司产品;IPTG、AMV 反转录酶、Ex Taq 酶均为大连宝生物工程有限公司产品。

1.3 引物设计与合成

根据 GenBank 中登录的水禽呼肠孤病毒 S2 基因序列设计了 1 对通用鉴定引物和 1 对扩增开放阅读框的特异性引物。通用鉴定引物上游引物 S2F: 5'-CTCGCATCTGCTGATCATAATTAC-3', 下游引物 S2: R5'-CGGGAATCGTGGTCTAGCG-3'; 扩增开放阅读框引物上游引物 S2YS: 5'-GCGGAATTCATGGCGCGTGCCGTGTA-3' (下划线处为 *EcoR* I 识别位点), 下游引物 S2YX: 5'-GCGCTCGAGCTAGACGGTAAAAGTGGCTA-3' (下划线处为 *Xho* I 识别位点)。由上海生物技术有限公司合成。

1.4 DRV-GZ 株的鉴定

参照 Invitrogen 公司的 RNA 提取试剂盒使用说明,用 Trizol 提取 DRV-GZ 株的总 RNA,以随机引物和 AMV 进行 cDNA 第一链的合成(42 °C 60 min)。然后用通用引物 S2F 和 S2R 进行 PCR 扩增(94 °C 3 min, 94 °C 50 s, 50 °C 50 s, 72 °C 50 s, 运行 30 个循环,最后于 72 °C 延伸 8 min)。预计扩增片段大小为 600 bp 左右。

1.5 DRV S2 基因的获取及测序

总 RNA 提取及 cDNA 第一链的合成同上。用

引物 S2YS 和 S2YR 进行 PCR 扩增(94 °C 3 min, 94 °C 1 min, 59 °C 1 min, 72 °C 1.5 min, 运行 30 个循环,最后于 72 °C 延伸 10 min), 扩增得到的 PCR 产物回收纯化后克隆入 pMD18-T 载体,再转化大肠杆菌 DH5 α 。可疑菌落经 PCR 和双酶切鉴定后,送 Invitrogen 公司进行目的基因测序。

1.6 重组表达质粒 pET-S2 的构建

将获取的阳性质粒及载体质粒 pET-28a(+)分别进行 *EcoR* I 和 *Xho* I 双酶切,然后按照常规方法将 S2 基因 cDNA 片段与线性化载体质粒 pET-28a(+)连接,并转化 DH5 α 感受态细胞,挑取可疑阳性菌落,经 PCR、酶切及测序鉴定后抽提质粒,命名为重组表达质粒 pET-S2。

1.7 S2 基因诱导表达时间的确定

将获得的重组质粒 pET-S2 转化 RosettaTM 2 (DE3)plysS 感受态细胞。挑取单菌落,37 °C 振荡培养,测定 $D_{600\text{nm}}$, 达到 0.4~0.6 时分 4 组进行试验;第 1 组不加 IPTG 作为诱导前对照,取 1 mL 菌液进行 SDS-PAGE 分析,2~4 组均加入 1 mmol/L IPTG 进行诱导,分别在诱导后第 4、6、8 h 吸取 1 mL 菌液,收集菌液进行 SDS-PAGE 分析。

1.8 S2 基因诱导剂 IPTG 浓度的确定

$D_{600\text{nm}}$ 达到 0.4~0.6 时,分 5 组进行试验;第 1 组不加 IPTG 作为诱导前对照,取 1 mL 菌液进行 SDS-PAGE 分析,2~5 组分别用 0.4、0.6、0.8、1.0 mmol/L 的 IPTG 进行诱导。收集各组诱导后第 4 h 的菌液,进行 SDS-PAGE 分析。

1.9 表达蛋白的可溶性分析

在重组质粒的最佳诱导时间和最佳 IPTG 浓度确定之后,将诱导的菌液离心弃去上清,加入适量 PBS(pH7.4),以 50 W 处理 2 min,间隔 5 s,共 5 次进行超声波裂解,4 °C 10 000 r/min 离心 15 min,分别取上清和沉淀,进行 SDS-PAGE 电泳,分析融合蛋白的可溶性。

1.10 表达蛋白的纯化

将 400 mL 经 IPTG 诱导的菌液进行超声裂解(50 W 处理 2 min,间隔 5 s,共 5 次)后,重悬于变性蛋白缓冲液中。冰浴 1 h,待蛋白彻底溶解后,4 °C 10 000 r/min 离心 30 min,弃上清,将收集的沉淀按 Amersham 蛋白纯化操作说明过镍柱纯化。

1.11 表达产物的 Western-blot 分析

表达产物先进行 SDS-PAGE 电泳,再经转膜、封闭,然后分别以抗 His 标签单抗和辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠 IgG 为一抗、二抗及以兔抗 DRV-GZ 阳性血清为一抗、辣根过氧化物酶标记的

山羊抗兔 IgG 为二抗反应,最后加 DAB 显色。

2 结果

2.1 DRV-GZ 株的 RT-PCR 鉴定

用呼肠孤病毒通用引物对 DRV-GZ 株进行 RT-PCR 扩增,获得相应大小的目的条带,而阴性对照未扩增出相应大小的片段(见图 1)。

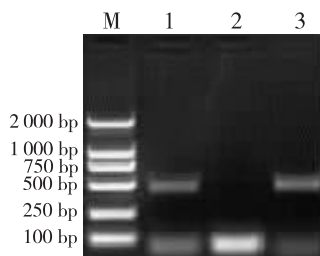


图 1 未知病毒 S2 基因的 RT-PCR 鉴定

Fig. 1 RT-PCR identification of S2 gene from an unknown virus

M:DNA 分子质量标准;1:呼肠孤病毒阳性对照;2:水阴性对照;3:呼肠孤病毒 DRV-GZ 株 S2 基因

M:DL2000 DNA Marker;1:The PCR product of ARV as positive control;2:Negative control;3:The PCR product of gene S2

2.2 DRV-GZ 株 S2 基因 ORF 的 RT-PCR 扩增

扩增产物经 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳,可见大小约 1 200 bp 的条带(见图 2)。序列测定结果表明,获得的 DRV-GZ 株 S2 基因 ORF 由 1 251 个核苷酸组成,编码 416 个氨基酸。与 GenBank 中登录的番鸭呼肠孤病毒 S12 株 S2 基因的核苷酸相似性最高,达 94.5%,氨基酸序列同源性 98.6%,6 个发生变化的氨基酸位置分别是第 22 位(R→C)、101 位(A→S)、123 位(S→T)、256 位(N→D)、348 位(S→P)和 395 位(A→U)。与鸭源呼肠孤病毒株 DRV044 的 S2 基因核苷酸序列的相似性为 93%。

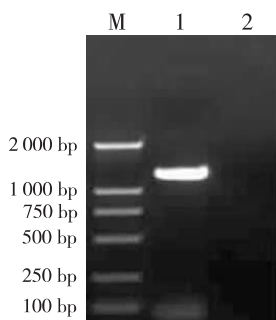


图 2 DRV-GZ S2 基因的 RT-PCR 扩增

Fig. 2 RT-PCR amplification of DRV-GZ gene S2

M:DNA 分子质量标准;1:S2 基因的 RT-PCR 扩增产物;2:以灭菌双蒸水为模板的空白对照

M:DL2000 DNA Marker;1:The product of gene S2 amplified by

RT-PCR;2:Blank control

2.3 重组质粒的酶切鉴定

重组质粒 pET-S2 经 *EcoR* I 和 *Xho* I 双酶切,得到 5 360 bp 左右的载体条带和 1 200 bp 左右的目的条(见图 3)。

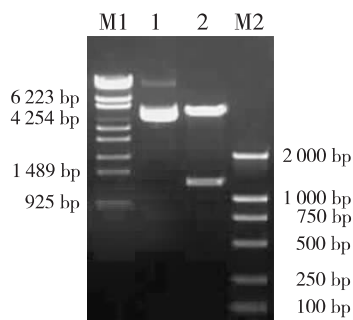


图 3 重组质粒 pET-S2 的酶切鉴定

Fig. 3 Identification of recombinant plasmid pET-S2

M1、M2:DNA 分子质量标准;1:重组质粒 pET-S2;2:重组质粒的 *EcoR* I + *Xho* I 双酶切产物

M1: λ -*EcoT*14 I digest; M2:DL2000 DNA Marker; 1: Recombinant plasmid pET-S2; 2: The product from recombinant plasmid pET-S2 digested by *EcoR* I + *Xho* I

2.4 S2 基因的融合表达与可溶性分析

应用 DNASTar Version 5.07 软件,根据片段的核苷酸序列推导蛋白的理论分子质量,载体上的部分融合蛋白[从 pET-28a(+)载体起始密码子 ATG 开始到 *EcoR* I 酶切位点 GAATTC 为止的一段核苷酸序列所编码的蛋白]的理论分子质量约为 4.0 ku,DRV σ A 蛋白基因全长 1 251 bp,编码 416 个氨基酸,分子质量约为 46.0 ku。因此,重组质粒 pET-S2 所表达的融合蛋白理论分子质量约为 50 ku。

2.4.1 S2 基因诱导表达时间的优化 37 °C 条件下,经 1 mmol/L 的 IPTG 诱导后,携带重组质粒 pET-S2 的重组菌在分子质量 50 ku 左右处有一明显的特异蛋白条带,而不携带任何质粒的载体菌以及携带载体质粒 pET-28a(+)的重组菌缺乏相应的条带。在 IPTG 浓度相同的情况下,诱导第 4 h 的表达效果最好,增加诱导时间无助于增加目的基因的表达量(见图 4)。

2.4.2 S2 基因诱导剂 IPTG 浓度的优化 优化结果显示,在固定诱导时间(4 h)的条件下,以 0.6 mmol/L 的 IPTG 诱导效果最好(见图 5)。增加 IPTG 浓度无助于增加目的基因的表达量。

2.4.3 S2 基因融合表达蛋白的可溶性分析及纯化 试验表明,IPTG 诱导第 4 h 的 pET-S2/Rosetta™ 2(DE3)plysS 超声处理蛋白以包涵体的形式存

在于沉淀中。蛋白纯化后得到相应大小、纯度很高的目的条带(见图 6)。

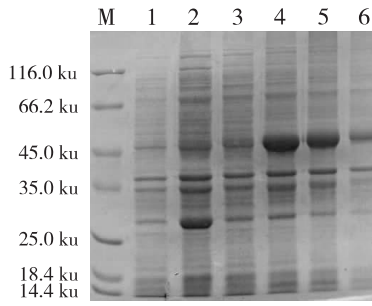


图 4 S2 基因诱导表达时间的优化

Fig. 4 Determination of induction time for S2 gene

M: 未预染的蛋白质分子质量标准; 1: pET-28a(+) 未经 IPTG 诱导; 2: pET-28a(+) 经 IPTG 诱导第 4 h; 3: pET-S2 未经 IPTG 诱导; 4: pET-S2 经 IPTG 诱导第 4 h; 5: pET-S2 经 IPTG 诱导第 6 h; 6: pET-S2 经 IPTG 诱导第 8 h

M: Unstained protein molecular weight Marker; 1: pET-28a(+) without induction with IPTG; 2: pET-28a(+) induction with IPTG for 4 h; 3: pET-S2 without induction with IPTG; 4: pET-S2 induction with IPTG for 4 h; 5: pET-S2 induction with IPTG for 6 h; 6: pET-S2 induction with IPTG for 8 h

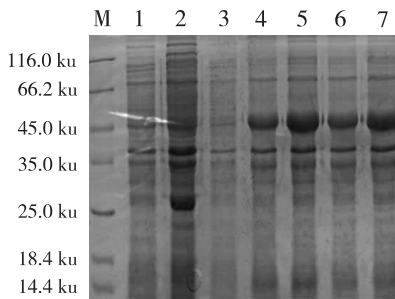


图 5 S2 基因融合表达诱导剂 IPTG 最佳浓度的优化

Fig. 5 Determination of optimal IPTG concentration to induce S2 gene expressed in fusion

M: 未预染的蛋白质分子质量标准; 1: pET-28a(+) 未经 IPTG 诱导; 2: pET-28a(+) 经 IPTG 诱导第 4 h; 3: pET-S2 未经 IPTG 诱导; 4: 0.4 mmol/L IPTG 诱导第 4 h; 5: 0.6 mmol/L IPTG 诱导第 4 h; 6: 0.8 mmol/L IPTG 诱导第 4 h; 7: 1.0 mmol/L IPTG 诱导第 4 h

M: Unstained protein molecular weight Marker; 1: pET-28a(+) without induction with IPTG; 2: pET-28a(+) induction with IPTG for 4 h; 3: pET-S2 without induction with IPTG; 4: Induction with 0.4 mmol/L IPTG for 4 h; 5: Induction with 0.6 mmol/L IPTG for 4 h; 6: Induction with 0.8 mmol/L IPTG for 4 h; 7: Induction with 1.0 mmol/L IPTG for 4 h

2.5 表达产物的 Western-blot 分析

表达产物的菌体总蛋白经 SDS-PAGE 后, 转移至硝酸纤维素膜, 与抗组氨酸标签的一抗及辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠 IgG 二抗进行蛋白印迹反应。结果显示, pET-S2 诱导后的菌体裂解产

物在硝酸纤维素膜上的相应位置出现了一条棕色印迹(见图 7A)。

纯化后的蛋白经 SDS-PAGE 后, 转移至硝酸纤维素膜, 以免抗 DRV-GZ 阳性血清为一抗, 辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG 为二抗, 进行蛋白印迹反应。结果显示, 纯化后的蛋白在硝酸纤维素膜上的相应位置出现了一条印迹(见图 7B), 而未纯化的蛋白除了相应大小的目的片段之外, 还出现了一些杂带。

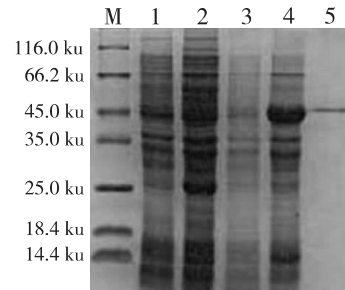


图 6 S2 基因融合表达蛋白的可溶性分析和纯化

Fig. 6 Solubility analysis and purification of the expressed protein

M: 未预染的蛋白质分子质量标准; 1: pET-28a(+) 未经 IPTG 诱导; 2: pET-28a(+) 经 IPTG 诱导第 4 h; 3: pET-S2 未经 IPTG 诱导; 4: pET-S2 经 IPTG 诱导第 4 h; 5: 纯化后的蛋白

M: Unstained protein molecular weight Marker; 1: pET-28a(+) without induction with IPTG; 2: pET-28a(+) induction with IPTG for 4 h; 3: pET-S2 without induction; 4: pET-S2 induction with IPTG for 4 h; 5: Purified protein

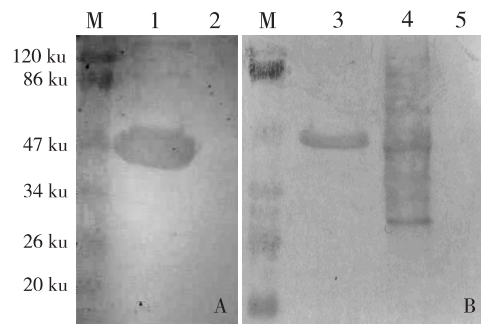


图 7 表达产物的 Western-blot 检测

Fig. 7 Western-blot test for the expressed protein

A: 以 His 标签单抗为一抗, 辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠 IgG 为二抗; B: 以免抗 DRV-GZ 阳性血清为一抗, 辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG 为二抗; M: 预染的蛋白质分子质量标准; 1: 纯化后的 S2 蛋白; 2: 诱导前的空白对照; 3: 纯化后的 S2 蛋白; 4: 纯化前的 S2 蛋白; 5: 诱导前的空白对照

A: Immunoblotting reaction using Anti-His Tag mouse monoclonal antibody and goat anti-mouse IgG-HRP; B: Immunoblotting reaction using rabbit positive serum against DRV-GZ and goat anti-rabbit IgG-HRP; 3: Purified S2 protein; 4: Unpurified S2 protein; 5: Blank control

M: Prestained protein molecular weight Marker; 1: Purified S2 protein; 2: Blank control;

3 讨论

呼肠孤病毒是禽类混合感染的重要致病因子之一,引起死亡、腿疾(病毒性关节炎或腱鞘炎)和总体生产性能低下,包括增重慢、饲料转化率低等^[8],往往造成很大损失。据 Meerman 等^[9]报道,曾经从患各种疾病(病毒性关节炎、腱鞘炎、慢性呼吸道病、吸收不良综合征以及肠道疾病、心肌炎、心包炎、肝炎、脾炎等)的禽分离到 ARV。鸭源呼肠孤病毒可以引起鸭群高的发病率,死亡率高达 50%,康复鸭也会出现生长停滞^[10]。

经用 DNASTar 软件中的 EditSeq 对获得的 DRV-GZ 株的 S2 开放阅读框进行分析。分析结果表明,S2 开放阅读框基因(ORF)由 1 251 个核苷酸组成,编码 416 个氨基酸。有 27 个强碱性氨基酸(K,R),26 个强酸性氨基酸(D,E)。151 个疏水性氨基酸(A,I,L,F,W,N)和 139 个极性氨基酸(N,C,Q,S,T,Y)。通过进化树分析可以看出,所分离的 DRV-GZ 株与番鸭和鹅的呼肠孤病毒株亲缘关系较近,位于同一分支;而与鸡呼肠孤病毒株亲缘关系较远,不在同一分支。鉴于对白鸭呼肠孤病毒 σ A 蛋白的研究相对较少,所以本试验选用了编码 σ A 蛋白的 S2 基因作为研究对象,采用一步法用自己设计的引物对分离的 DRV-GC 株 S2 基因进行了扩增,收到了很好的效果,特异性地扩增出了约 1 200 bp 的片段,序列分析表明,与国内分离的番鸭呼肠孤病毒 S12 株 S2 基因的核苷酸序列同源性为 94.5%,氨基酸同源性为 98.6%,2 毒株的同源性很高,几处的碱基差异属于同义突变。

进行蛋白表达时,本试验首先采用 BL21(DE3)plysS 宿主表达菌,但是经多次诱导摸索后,仍然未见明显的目的蛋白表达。后来改用 RosettaTM 2 (DE3)plysS 宿主表达菌,即可见明显的目的蛋白表达带出现。可见蛋白表达时宿主菌的选择非常重要。本试验采用了 2 组一抗和二抗,分别为抗 His 标签的一抗、辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠 IgG 二抗及兔抗 DRV-GZ 阳性血清一抗、辣根过氧

化物酶标记的山羊抗兔 IgG 二抗,对 IPTG 诱导后的表达阳性菌和阴性菌经进行 Western-blot 分析,表达的 σ A 蛋白与抗 His 标签的一抗和抗 DRV-GZ 阳性血清有较强的反应活性,而表达的阴性菌无特异性反应条带,说明表达的蛋白具有较好的反应性。

本研究表达的白鸭呼肠孤病毒的 σ A 蛋白为下一步研究其功能奠定了基础。

参考文献(References)

- [1] ROBERTSON M D, WILCOX G E. Avian reovirus[J]. *Vet Bull*, 1986, 56: 155-174.
- [2] VAN DER HEIDE L. The history of avian reovirus[J]. *Avian Dis*, 2000, 44(3/4): 638-641.
- [3] HEFFELS U R, MULLER H, KALETA E F. Structural and biological characteristics of reoviruses isolated from Muscovy ducks(*Cairina moschata*)[J]. *Avian Pathol*, 1992, 21(3): 481-491.
- [4] DOCHERTY D E, CONVERSE K A, HANSEN W R, *et al.* American woodcock (*scolopax minor*) mortality associated with a reovirus[J]. *Avian Dis*, 1994, 38(3/4): 899-904.
- [5] HOLLMEN T, FRANSON J C, KILPI M, *et al.* Isolation and characterization of a reovirus from common eiders(*Somateria mollissima*) from Finland[J]. *Avian Dis*, 2002, 46(2): 478-484.
- [6] 殷震, 刘景华. 动物病毒学[M]. 2 版. 北京: 科学出版社, 1997: 538-548.
YIN Zhen, LIU Jing-hua. *Animal Virology*[M]. 2nd ed. Beijing: Science Press, 1997: 538-548. (in Chinese)
- [7] 刘红, 吴志新, 郁宏伟, 等. 一种新病毒性鸭病的初步研究[J]. 养禽与禽病防治, 2007(6): 2-4.
LIU Hong, WU Zhi-xin, YU Hong-wei, *et al.* Initial study of a new viral duck disease[J]. *Poultry Husbandry and Disease Control*, 2007(6): 2-4. (in Chinese)
- [8] MEANGER J, WICKRAMASINGHE R. Association between the σ C protein of avian reovirus and virus-induced fusion of cells[J]. *Arch Virol*, 1999, 144(1): 193-197.
- [9] MEERMAN H, GEOGIOS G. Construction and characterization of a set of *Escherichia coli* strains deficient in all known loci affecting the proteolytic stability of secreted recombinant proteins[J]. *Bio-technology*, 1994, 12(11): 1107-1110.
- [10] ZHANG Y, GUO D, LIU M, *et al.* Characterization of the sigma B-encoding genes of Muscovy duck reovirus: sigma C-sigma B-ELISA for antibodies against duck reovirus in ducks[J]. *Vet Microbiol*, 2007, 121(3/4): 231-241.

(责任编辑 左翠萍)